

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 56-035050

(43)Date of publication of application : 07.04.1981

(51)Int.Cl.

G01N 27/46

C12Q 1/00

(21)Application number : 54-110816

(71)Applicant : OMRON TATEISI ELECTRONICS CO

(22)Date of filing : 29.08.1979

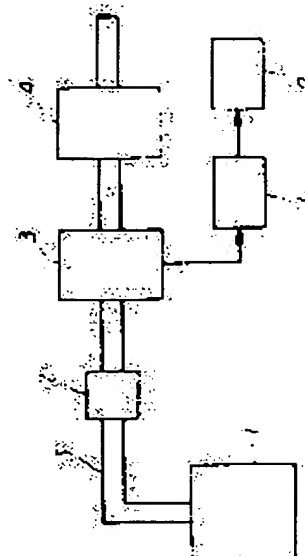
(72)Inventor : TAKIZAWA KOICHI  
KAEDE KUNIO

## (54) MEASURING METHOD OF SUBSTRATE CONSTANT

### (57)Abstract:

**PURPOSE:** To increase the measuring accuracy of quantitative analysis of glutamic acid at low concentration solution, by using the merdola blue as electron carrier.

**CONSTITUTION:** In the buffer solution tank 1, for example, NAD in  $1\mu\text{M}$ , enzyme for dehydrogen for glutamic acid in  $0.1\text{W}10$  units/ml, and phosphoric acid buffer solution in pH7.4 of  $0.05\text{M}$  including  $10\mu\text{M}$  merdola blue and  $0.1\text{M}$  potassium chloride, are put in. Further, the sample glutamic acid is injected from the intake 2 and the buffer solution and reagent are fed to the electrode 3 with the pump 4. As the electrode 3, active electrode, and as platinum contrast electrode, silver-silver chloride are used. In this case, corresponding to the amount of glutamic acid, NAD becomes NADH. The NADH is changed into NAD by using the oxygen type merdola blue, and reduction type merdola blue changed corresponding to NADH is oxidized electrochemically by using the electrode 3, and the current of oxidation is measured by the current voltage converter 6 and the voltmeter 7 to estimate the glutamic acid.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

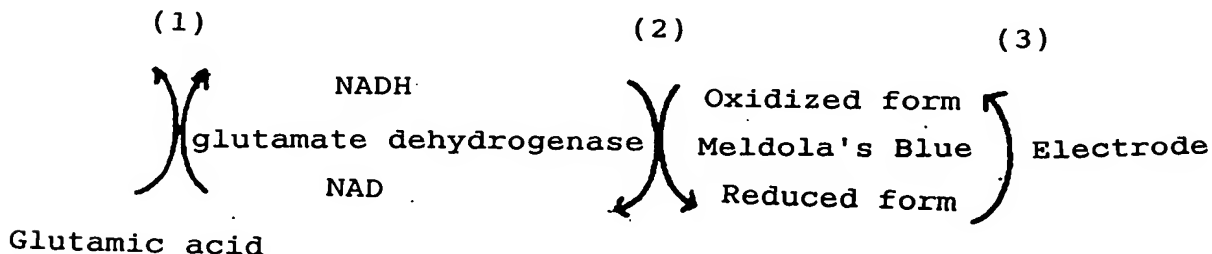
[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

(Translation from line 1 in page 4 to line 11 in page 6 of the specification)

Fig. 1 shows a schematic constitution of the apparatus for carrying out the present invention. In this Figure, the numeral "1" represents a buffer tank to which 0.05 M phosphate buffer, pH 7.4 containing 1 mM NAD, 0.1 to 10 (unit/ml) glutamate dehydrogenase, 10  $\mu$ M Meldola's Blue and 0.1 M potassium chloride is fed. The numeral "2" represents an inlet of a sample containing a certain amount of glutamic acid, while the numeral "3" represents an electrode in which platinum is used as a working electrode while silver-silver chloride is used as a reference electrode. The numeral "4" represents a pump which introduces the buffer within the buffer tank 1 and glutamic acid, which is injected from the inlet 2, to the electrode 3 via a sample passage 5, and then introduces into a waste pooling vessel (not shown in the figure). The numeral "6" represents a current-voltage transducer, and the numeral "7" represents a digital volt meter.

Referring now to operation of the apparatus constituted as described above, when the buffer and the sample are introduced to the electrode 3 by the pump 4 at a flow rate of 0.1 ml/min, amount of glutamic acid in the sample can be measured according to the following schematic illustration.



More specifically, in the step (1), an enzymatic reaction is caused among glutamic acid, NAD and glutamate dehydrogenase. Depending on the amount of glutamic acid, NAD is converted into

NADH. In the step (2), the NADH is converted into NAD using oxidized Meldola's Blue, and in the step (3), reduced Meldola's Blue converted depending on the amount of NADH is oxidized electrochemically using the electrode. The oxidation current then is measured to determine the amount of glutamic acid.

Relationship between the electrode current output (nA) then and glutamic acid concentration (mM) is shown in Fig. 2 as a calibration curve A. In the Figure, calibration curve B shows the case in which 50  $\mu$ M Meldola's Blue was used as an electron carrier, while calibration curve C shows the case in which 0.1 mM PMS was used. From these calibration curves, it is comprehended that sufficiently greater alteration of the current value can be achieved with Meldola's Blue than with PMS.

In the Example described above, NAD and glutamate dehydrogenase were for single use, however, repetitive use is permitted when glutamate dehydrogenase is immobilized on NAD via a spacer, and the immobilized product is allowed to retain on the surface of an electrode with a dialysis membrane. Accordingly, costs for the measurement can be reduced.

Moreover, NADP (nicotine · amide · adenine · dinucleotide · phosphate) may be used in stead of NAD.

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭56—35050

⑪ Int. Cl.<sup>3</sup>  
G 01 N 27/46  
C 12 Q 1/00

識別記号

庁内整理番号  
7363—2G  
7349—4B

⑬ 公開 昭和56年(1981)4月7日

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 3 頁)

⑭ 基質量の測定方法

⑯ 特 願 昭54—110816

⑰ 出 願 昭54(1979)8月29日

⑱ 発 明 者 滝沢耕一

京都市右京区花園中御門町3番  
地株式会社立石ライフサイエン

ス研究所内

⑲ 発 明 者 楓邦男

京都市右京区花園中御門町3番  
地株式会社立石ライフサイエン  
ス研究所内

⑳ 出 願 人 立石電機株式会社

京都市右京区花園土堂町10番地

明 細 書

1. 発明の名称

基質量の測定方法

2. 特許請求の範囲

(1) NAD(P)を必要とする酵素反応を含む1  
又は2以上の酵素反応から成る酵素反応におい  
て、基質量に対応して変化したNAD(P)H  
を酸化型メルトーフブルーを用いて酸化し、そ  
の結果生じる還元型メルトーフブルーを電極を  
用いて酸化し、その時の酸化電流を測定して基  
質量を測定するようにした基質量の測定方法。

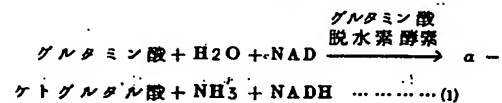
(2) 前記NAD(P)と酵素を固定化し、電極近  
傍に保持させたことを特徴とする特許請求の範  
囲第(1)項記載の基質量の測定方法。

3. 発明の詳細な説明

この発明は基質量の測定方法に関し、とくに酵  
素反応の結果生じる還元型水素伝達体を電極を用  
いて電気化学的に酸化し、そのときの酸化電流を  
測定して基質量を測定する方法に関する。

従来方法の一例を説明すると、グルタミン酸を

定量するとき、水素伝達体としてNAD(ニコチ  
ン・アミド・アデニン・ダイヌクレオチド)を使  
用して以下の酵素反応を行なわせる。



以上の酵素反応において、酸化型水素伝達体であ  
るNADは還元型水素伝達体であるNADHに変  
化する。このNADHを電極を用いて電気化学的  
に酸化しNADに戻すとともに、そのときの酸化  
電流を測定してグルタミン酸を測定する。

以上のような測定方法においては、補酵素であ  
るNADの電気化学反応の効率が悪く、そのため  
電流変化値が微小であり応答速度も遅くなる。ま  
た電極印加電圧が0.5～1.0Vと比較的高値であ  
るため安定した電流値が得られず、場合によつて  
は電極出力に干渉物質が影響してくるなど実用化  
のためには多くの問題点を有している。

上述の問題点を解決するためにエレクトロニック  
ヤリフが利用されている。

( 1 )

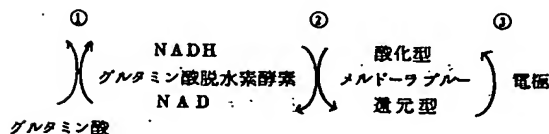
( 2 )

以下、この発明の一実施例をグルタミン酸を測定する例として説明する。

第1図は、この発明を実施するための装置の概略構成を示すもので、1は緩衝液タンクで1mℓのNAD、0.1~1.0(ユニット/ℓ)のグルタミン酸脱水素酵素、10μMのメルドーラブル-および0.1Mの塩化カリウムを含む0.05Mのリン酸緩衝液pH7.4を流入しておく。2は一定量のグルタミン酸を含む試料の注入口、3は電極で作用電極として白金、対照電極として銀-塩化銀を用いている。4はポンプで試料通路5を介して緩衝液タンク1内の緩衝液と注入口2から注入されるグルタミン酸を電極3へ導いたのち、廃液溜(図示せず)へ導く。6は電流電圧変換器、7はデジタルボルトメータである。

上述のように構成された装置の動作を説明すると、ポンプ4により緩衝液および試料を0.1mℓ/minの流速で電極3へ導くと、以下の模式で示すようにして試料中のグルタミン酸の量を測定することができる。

(3)



すなわち、①においてグルタミン酸、NAD、およびグルタミン酸脱水素酵素との間で酵素反応が行われ、グルタミン酸の量に対応してNADはNADHになる。②において、このNADHを酸化型メルドーラブルを用いてNADとし、③において、NADH量に対応して変化した還元型メルドーラブルを電極を用いて電気化学的に酸化させ、その時の酸化電流を測定してグルタミン酸を定量する。

このときの電極電流出力(mA)とグルタミン酸濃度(mM)の関係を第2図の検量線Aで示す。同図において検量線Bは50μMのメルドーラブルを電子キャリアとして用いた場合、検量線Cは0.1mMのPMBを用いた場合のものであり、これらの検量線からメルドーラブルの

(5)

(4)

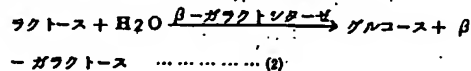
方がPMBよりも低濃度でも充分大きな電流変化値が得られることが理解される。

なお、上述の実施例においては、NADとグルタミン酸脱水素酵素を使い棄てとしたが、NADにスベイスを介してグルタミン酸脱水素酵素を固定化したものを透析膜で電極表面に保持させておけば、繰返して使用することができ、測定経費が安くなる。

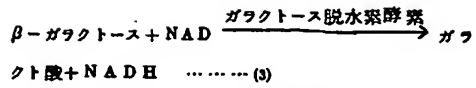
また、NADに代えてNAD<sup>+</sup>(ニコチン・アミド・アデニン・ディヌクレオチド・フォスフェイト)を使用しても良い。

また、この発明を使用して測定可能な基質はグルタミン酸に限らずグルコース、フルクトース、エタノール等種々のものが存在するし、酵素反応としても1つの酵素反応に限らず、NAD(P)を必要とする酵素反応を含む2以上の酵素反応から成る酵素反応の場合においても適用できる。

たとえば、フルクトースを定量するときは



(6)



式(2)、(3)で示すとおり2つの酵素反応からなり、(3)式で生成したNADHをメルドーラブルーを用いて酸化し、その結果生じる還元型メルドーラブルーを電極を用いて酸化し、そのときの酸化電流を測定してラクトースを定量できる。

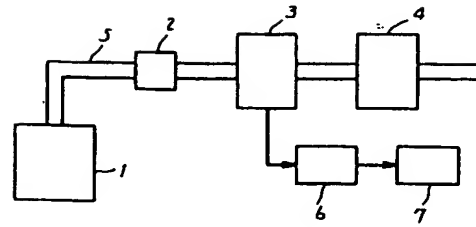
#### 4. 図面の簡単な説明

図面はこの発明の一実施例を示すもので、第1図はこの発明の方法を実施するための装置の一例を示す概略構成図、第2図はメルドーラブルーを用いてグルタミン酸濃度を測定した場合の電極電流の変化を示す図である。

特許出願人 立石電機株式会社

( 7 )

第1図



第2図

